

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

POKUSNA CJEPIVA PROTIV HIV-a

EXPERIMENTAL VACCINES AGAINST HIV

SEMINARSKI RAD

Valentina Karin

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Mirna urkovi Perica

Zagreb, 2013.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. POKUSNA CJEPIVA	3
2.1. Široko neutralizirajuća protutijela (bNAbs) u suzbijanju infekcije izazvane HIV-om ...	3
2.2. Virusima slične čestice u razvoju cjepiva protiv HIV-a	5
2.3. Dizajniranje anti-HIV-1 protutijela	7
2.4. Korištenje staninog odgovora CD4 ⁺ T-limfocita u razvoju cjepiva protiv HIV-a	13
2.5. Novi analozi nukleotida u liječenju infekcije HIV-om	16
3. PREPREKE U USPJEŠNOM RAZVOJU CJEPIVA PROTIV HIV-a	17
4. LITERATURA	19
5. SAŽETAK	21
6. SUMMARY	22

1. UVOD

HIV (virus humane imunodeficijencije) je retrovirus koji napada imunosni sustav ovjeka, to nije $CD4^+$ T-limfocite- bijele krvne stanice koje su važan dio imunosnog sustava. U tim stanicama HIV se množi i postupno uništava sve ve i broj T limfocita, što dovodi do slabljenja imuniteta i rezultira pojavom oportunisti kih infekcija i odre enih malignih bolesti. Pored $CD4^+$ T stanica HIV napada makrofage i dendriti ke stanice.

estica HIV-a je sfernog oblika. S vanjske strane nalazi se virusna ovojnica koju ini dvoslojna lipidna membrana podrijetlom iz stanice u kojoj je virus nastao, a u dvoslojnoj membrani uronjene su (u prosijeku) 72 kopije Env kompleksa proteina. Svaki kompleks se sastoji od tri molekule glikoproteina gp120- receptor za CD4 i CCR5 (ili CXCR4) i tri molekule glikoproteina gp41. Gp120 i gp41 nastaju cijepanjem gp160. Oni su važni za vezanje virusne estice i ulazak samog virusa u stanicu doma ina. Veliki dio istraživanja za razvoj cjepiva protiv HIV-a usmjeren je na ove proteine virusne ovojnice. Ispod ovojnice nalazi se kapsida koja se sastoji od oko 2000 kopija proteina p24. U kapsidi se nalaze dvije jednolan ane molekule RNA, nukleokapsidni protein p7 i tri enzima- reverzna transkriptaza (p64), proteaza (p10) i integraza (p32) (www.niaid.nih.gov).

HIV se može prenijeti nezašti enim spolnim odnosom, kontaktom sa zaraženom krvi, s majke na dijete tijekom trudno e, za vrijeme poro aja ili za vrijeme dojenja novoro en eta (www.mayoclinic.com). Krajnji i najteži stadij infekcije HIV-om je AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) koji je uzrokovan teškim ošte enjem imunosnog sustava. AIDS je zapravo naziv za skupinu bolesti koje se pojavljuju kao posljedica slabljenja imuniteta ovjeka koji je inficiran HIV-om. Brojni mikroorganizmi s kojima se ovjek svakodnevno suo ava i uspješno ih svladava, u bolesnika s AIDS-om dovode do nastanka širokog spektra upalnih bolesti te bolesnik na koncu umre od infekcije uzrokovane mikroorganizmom

(bakterije, virusi, gljivice, itd.) koja za zdrave ljude ne predstavlja znatnu opasnost (www.zdravlje.hr).

2. POKUSNA CJEPIVA

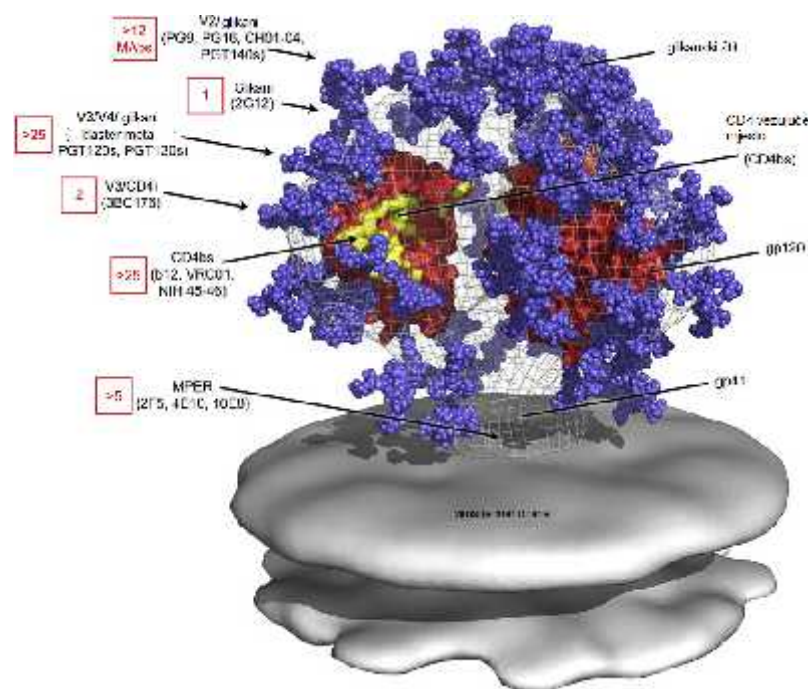
Zadnjih trideset godina razvili su se mnogi pristupi za razvoj cjepiva protiv HIV-a pri čemu su se koristili peptidi, proteini, nukleinske kiseline, virusni vektori i „prime-boost“ strategija. Veliki dio istraživanja za suzbijanje infekcije izazvane HIV-om usmjeren je na poticanje proizvodnje široko neutralizirajućih protutijela (broadly neutralizing antibodies- bNAbs) koja bi snažno neutralizirala većinu HIV-1 sojeva (Koff i sur. 2013). Virus HIV-a pokušava se nadmudriti i na način da se dizajniraju anti-HIV-1 protutijela, koriste se novi nukleotidi i estere slične virusima (virus-like particles- VLPs) te se pokušava iskoristiti stanje prije odgovora CD4⁺ T limfocita. Još se nije razvilo cjepivo koje bi uspješno kontroliralo infekciju izazvanu HIV-om, međutim istraživanja koja se provode daju nam nadu da bi u skoroj budućnosti tom smrtonosnom ubojici mogao doći kraj.

2.1. Široko neutralizirajuća protutijela (bNAbs) u suzbijanju infekcije izazvane HIV-om

Virus HIV-a je nepredvidivo varijabilan pa se poticanje proizvodnje široko neutralizirajućih protutijela čini kao najbolje rješenje za postizanje globalno učinkovitog cjepiva jer bi takva protutijela mogla neutralizirati veliku većinu HIV-1 sojeva. Među široko neutralizirajućim protutijelima su trimerni glikoproteini (Env) koji se nalaze na virusnoj ovojnici HIV-a pa su to ujedno i najranjivija mjesta (Koff i sur. 2013). Ciljna mjesta široko neutralizirajućih protutijela su različiti epitopi na Env, a to su CD4 vezujuće mjesto (gp120),

glikan ovisni epitopi, epitopi ovisni o kvartarnoj strukturi i proksimalno eksternalna regija membrane (membrane proximal external region- MPER) (Burton i sur. 2012) (Sl. 1.).

Nedavno istraživanje pokazalo je da se široko neutralizirajuća protutijela pojavljuju dvije godine nakon infekcije. Smatra se da je neutralizacija široko neutralizirajućim protutijelima povezana s vremenom postinfekcije, razinom viremije u plazmi, brojem $CD4^+$ T limfocita i avidnosti vezanja za proteine ovojnice. Izolacijom višestrukih široko neutralizirajućih protutijela koja prepoznaju slične epitope pokazalo se da su za njihovo prepoznavanje potrebne određene strukturne značajke (npr. dugi CDRH3, polireaktivnost, domena izmjene, visoke razine somatske hipermutacije, posttranslacijske modifikacije, itd.). Somatska hipermutacija je proces kojim su potaknute mutacije u varijabilnim područjima protutijela da bi im se povećala raznolikost. Prema tome, trebalo bi dizajnirati imunogene i/ili imunizacijske protokole koji bi povećali afinitet sazrijevanja (npr. adjuvanse, virusne vektore, itd.) pri čemu bi se potakla brža pojava i proizvodnja široko neutralizirajućih protutijela. Visoka razina somatske hipermutacije javlja se kao rezultat kronične stimulacije antigenom koja se javlja zbog dugotrajne infekcije HIV-om. Stoga bi bilo moguće proizvesti imunogene i/ili imunizacijske protokole koji bi mogli skratiti put proizvodnje široko neutralizirajućih protutijela (protutijela bi se pojavila ubrzo nakon stimulacije imunogenom) što bi rezultiralo nižom razinom somatske hipermutacije (koja je inače rezultat kronične stimulacije antigenom) (Burton i sur. 2012).



Slika 1. Struktura Env kompleksa proteina i ciljna mjesta protutijela

(Prilagođeno na temelju Burton *i sur.* 2012)

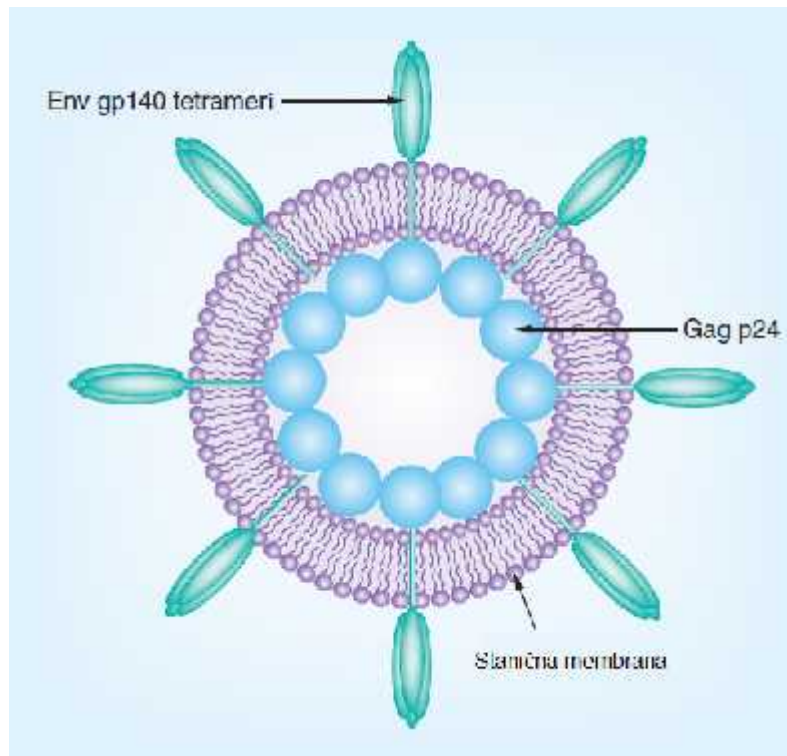
Da bi se potakla proizvodnja protutijela za uništavanje HIV-a, prvo se koristio rekombinantni protein (gp120) s aluminijem kao adjuvansom, ali takva vrsta cjepiva nije uspjela kontrolirati infekciju HIV-om kod muškaraca koji su imali spolni odnos s muškarcima i kod osoba koje su intravenozno ubrizgavale drogu (Koff *i sur.* 2013). S ciljem poticanja stani ne imunosti da bi se kontrolirala infekcija HIV-om, korišten je rekombinantni adenovirus tipa 5 koji je sadržao *gag*, *pol* i *nef* gene HIV virusa. Ni taj pokušaj sprjeavanja i kontrole HIV-a nije uspio kod muškaraca koji su imali spolni odnos s muškarcima. Pokazalo se da su neobrezani muškarci s prirodno stečenom imunosti na Ad5 (imaju Ad5 specifična protutijela) doživjeli prolazan period povećanog rizika od infekcije HIV-om. Istraživanja su pokazala da se to dogodilo jer se imunogenost proteina kodiranih genima koji su ubačeni u Ad5 vektor smanjila zbog toga što postoje ih Ad5 specifična protutijela neutraliziraju. Unatoč neuspjehu, nije isključen interes za korištenje adenovirusnih vektora u istraživanju cjepiva protiv HIV-a. Adenovirusni vektori su privlačni zbog jednostavne proizvodnje, ne koštaju puno i zbog snažne imunogenosti. Takvi vektori koristili bi se kod ljudi koji nisu bili izloženi Ad5, tj. koji nemaju Ad5 specifična protutijela (Michael 2012). Prvi signal za sprjeavanje infekcije HIV-om pružila je „prime-boost“ strategija gdje je korišten canarypox vektor (prime) i monomerni gp120 (boost), doduše s 31,2%-tnom učinkovitosti u kod heteroseksualaca i umjerenim rizikom od infekcije HIV-om (Koff *i sur.* 2013). Razvoj metoda pomoću kojih se nastoji potaknuti proizvodnja široko neutralizirajućih protutijela još je u tijeku i ulijeva nadu da će se ubrzo moći poduzeti i neki konkretni potezi za ostvarenje dugoročnog cilja- iskorjenjivanja HIV-a.

2.2. Virusima slične čestice u razvoju cjepiva protiv HIV-a

Virusima slične čestice (virus-like particles- VLPs) su supramolekulske nakupine koje se sastoje od virusnih kapsidnih proteina koji se sami sastavljaju u čestice slične strukture nalik virusima od kojih su nastali. Virusima slične čestice ne mogu se replicirati niti izazvati infekciju pa stoga predstavljaju sigurno i učinkovito cjepivo koje može potaknuti B- i T-stanični odgovor. Virusima slične čestice koriste se i kao sustavi dostave antigenskih struktura kao i DNA molekula. Mogu se proizvesti od virusa koji imaju ovojnicu i onih koji je nemaju (Buonaguro *i sur.* 2013, www.meetingsmanagement.co.uk).

Virusima sli ne estice oponašaju viruse od kojih su nastale pa niz konformacijskih antigena prikazuju stanicama uro ene imunosti što dovodi do aktivacije adaptivnog i upalnog odgovora. Antigen prezentiraju e stanice (APC) internaliziraju virusima sli ne estice pri emu se antigeni koji su bili u sastavu virusima sli nih estica prezentiraju preko MHC I i MHC II molekula izazivaju i pri tome u inkovit odgovor $CD4^+$ pomo ni kih T-limfocita i $CD8^+$ citotoksi nih T-limfocita. Virusima sli ne estice poti u i humoralnu i stani nu imunost. Me utim, da bi one potaknule snažan T- stani ni odgovor, uro eni imunosni sustav i posebno antigen prezentiraju e stanice moraju se dodatno potaknuti (npr. interferonom 1 i proupalnim citokinima). Prema tome, koadministracija virusima sli nih estica s dodatnim poticajem uro enog imunosnog sustava rezultirat e snažnim odgovorom citotoksi nih T-limfocita (Buonaguro i sur. 2013).

Kao mogu e cjepivo protiv HIV-a razvijen je HIV-1 Pr55Gag VLP model da bi se dostavili epitopi ili cijeli proteini ovojnice HIV-a u organizam kako bi se potakla oba puta imunosnog odgovora. Nekoliko preklini kih istraživanja pokazalo je da su HIV-virusu sli ne estice visoko u inkovite kod poticanja efikasnog humoralnog i stani nog imunosnog odgovora. Kod Gag-RT fuzije VLP poja an je $CD8^+$ T-stani ni odgovor. Umetanje V3 epitopa HIV-1 virusa u Pr55gag sekvencu rezultira poticanjem umjerenog imunosnog odgovora na epitope HIV-1 virusa. Cijela gp120 molekula bila je izražena na Pr55gag-VLP kao konformacijski antigen, a nedavno je i cijeli trimerni oblik HIV-1 proteina ovojnice bio izražen na površini Pr55gag-VLP. Svi ovi pristupi potaknuli su Env- specifi ni humoralni i stani ni imunosni odgovor (Buonaguro i sur. 2013) (Sl. 2.).



Slika 2. Gag HIV-virusu slične estice obavijene membranom
(Prilagođeno na temelju Buonaguro *i sur.* 2013)

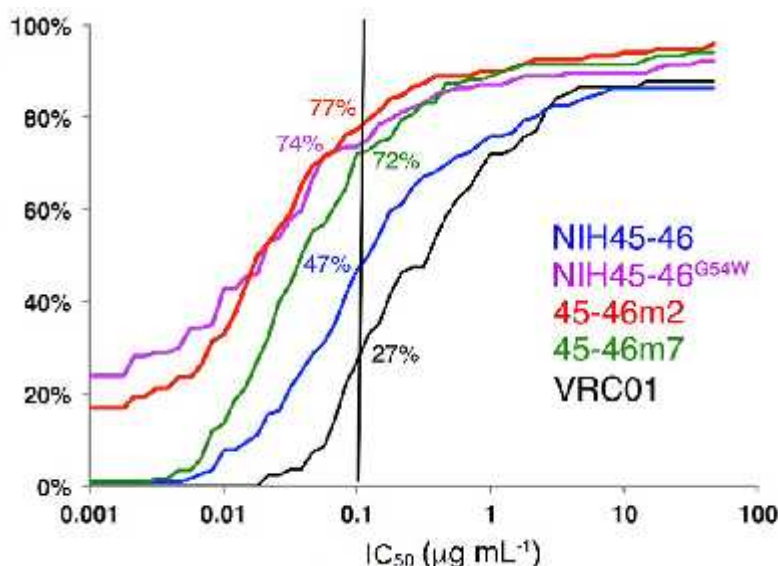
Virusima slične estice su snažan alat u razvoju cjepiva protiv HIV-a i predstavljaju strategiju koja je najbliža nativnim virusima kad je riječ o prikazivanju i dostavljanju konformacijskih epitopa pri čemu se potiče proizvodnja protutijela i imunski odgovor u svojoj cjelini. Poteškoće testiranja virusima sličnih estica u kliničkim istraživanjima javljaju se uglavnom zahvaljujući tehničkim i regulatornim poteškoćama koje su značajno usporile razvoj virusima sličnih estica kao cjepiva. Unatoč tomu tehnologija VLP u nadolazećim godinama, zbog svojih velikih prednosti koje su već prije navedene, mogla bi igrati važnu ulogu u istraživanju cjepiva protiv HIV-a (Buonaguro *i sur.* 2013).

2.3. Dizajniranje anti-HIV-1 protutijela

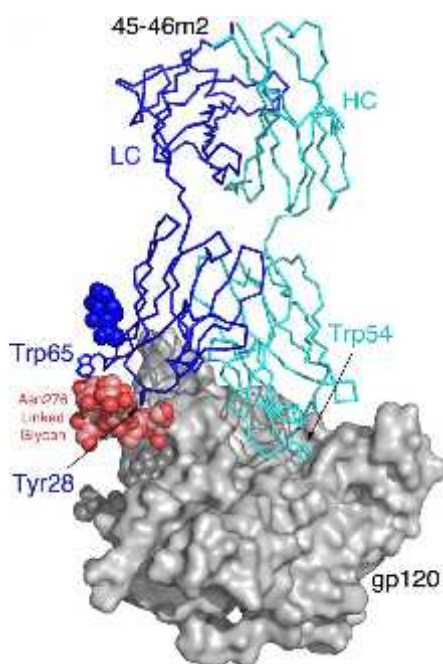
Nedavno identificirana široko neutralizirajuća protutijela koja snažno neutraliziraju većinu HIV-1 sojeva uključena su u terapijama koje koriste protutijela za suzbijanje infekcije izazvane HIV-om. Da bi se olakšalo njihovo korištenje kao terapeutika, kroz mutacije im je povećana snaga i otpornost na još više HIV-1 sojeva. Dizajnom temeljenim na strukturi stvoreno je široko neutralizirajuće protutijelo NIH45-46^{G54W} koje pokazuje veću snagu i širinu u odnosu na druga široko neutralizirajuća protutijela. NIH45-46^{G54W} protutijelo nastalo je

promjenom jedne aminokiseline iz NIH45-46 protutijela koje je do tada bilo najsnažnije široko neutraliziraju e protutijelo. Ciljna mjesta tih protutijela su CD4 vezuju a mjesta na trimernom kompleksu HIV-1 virusa. Supstitucija G54W omogu uje NIH45-46^{G54W} protutijelu da koristi konzervirani hidrofobni džep (Phe43 džep) na površini gp120, u koji se ina e smješta Phe43_{CD4} CD4 molekule, ime se poboljšava i vezanje i neutralizacija. Me utim, postoji mala skupina HIV-1 klonova koja je prirodno otporna na neutralizaciju NIH45-46^{G54W} protutijelima i ti mutanti HIV-1 virusa javljaju se za vrijeme izloženosti NIH45-46^{G54W} protutijelima. Da bi se neutralizirali i ti mutanti potrebno je pove ati u inkovitost NIH45-46^{G54W} protutijela na na in da im se produži kontakt s gp120 i da se uvedu dodatne pogodne supstitucije (Diskin i sur. 2013).

Da bi se pove ala u inkovitost NIH45-46^{G54W} protutijela, u njihov laki lanac (LC) uvedena je S28Y supstitucija. NIH45-46^{G54W(HC), S28Y(LC)} protutijela (skrako nazvana 45-46m2) bila su snažna kao i NIH45-46^{G54W} protutijela, ali su imala ve u širinu, tj. neutralizirali su više HIV-1 sojeva nego NIH45-46^{G54W} protutijela (Sl. 3.). Uspore ivane su neutraliziraju e aktivnosti NIH45-46^{G54W} i 45-46m2 protutijela pri emu su korišteni virusi koji su bili visoko otporni na poznata široko neutraliziraju a protutijela. VRC01 protutijela neutralizirala su vrlo malo virusnih klonova, NIH45-46^{G54W} protutijela su bila umjereno u inkovita u neutralizaciji, dok su 45-46m2 protutijela neutralizirala sve virusne klonove s više od deset puta ve om snagom od NIH45-46^{G54W} protutijela. Da bi se istražio mehanizam zaslužan za poja anu snagu 45-46m2 protutijela, riješena je kristalna struktura 45-46m2 protutijela vezanog na 93TH057 gp120 (Sl. 4.) i uspore ena sa strukturom NIH45-46^{G54W} protutijela vezanog na isti gp120. Površina zauzeta 45-46m2/gp120 kompleksom bila je ve a nego površina zauzeta NIH45-46/gp120 ili NIH45-46^{G54W}/gp120 kompleksom. Ve a zauzeta površina 45-46m2/gp120 kompleksa rezultat je predvi enog ulaska Trp54_{45-46m2} u Phe43_{CD4} džep na površini gp120. Zbog toga 45-46m2 protutijela pokazuju ve i afinitet i sporiju disocijacijsku stopu od NIH45-46 ili NIH45-46^{G54W} protutijela (Diskin i sur. 2013).



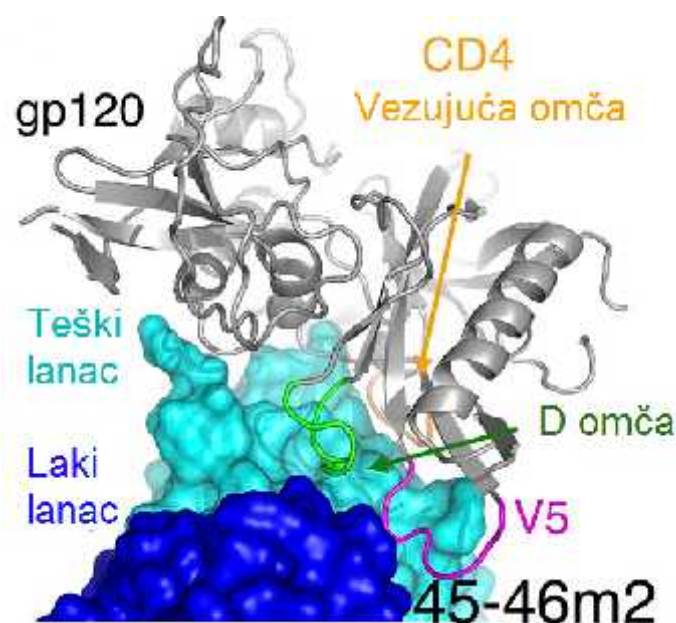
Slika 3. Usporedba mogućnosti neutralizacije različitim mutantima NIH45-46 protutijela (na slici se vidi da je najveća neutralizacijska aktivnost kod 45-46m2 protutijela)
(Diskin *i sur.* 2013)



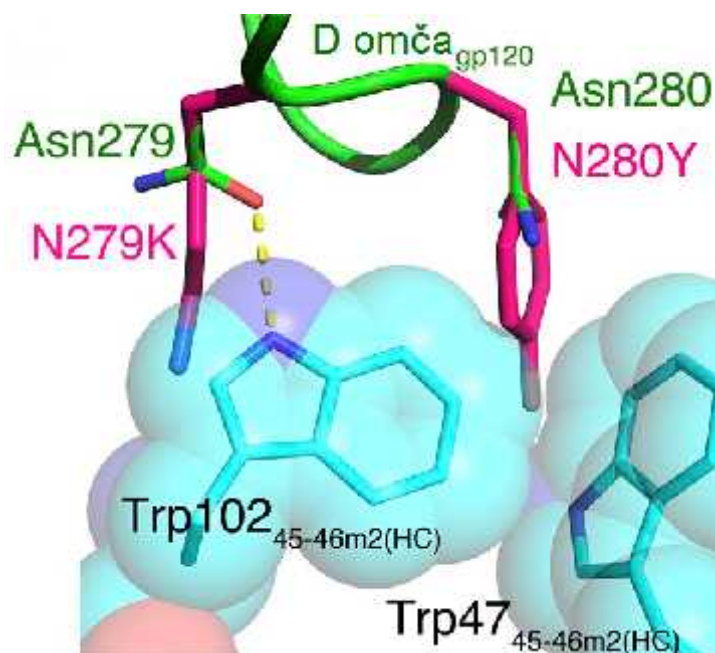
Slika 4. Struktura 45-46m2/gp120 kompleksa
(Diskin *i sur.* 2013)

Ispitana je interakcija između 45-46m2 protutijela i gp120 aminokiselinskih ostataka unutar gp120 konsenzusne sekvence uključene u otpornost na NIH45-46^{G54W} protutijelo. Kod najotpornijih HIV-1 sojeva dolazi do zamjene aminokiselina kod visoko konzerviranih aminokiselinskih ostataka u gp120 D i V5 omeđi uključujući i Asn279_{gp120}/Asp279_{gp120},

Asn280_{gp120} (D om a), Gly458_{gp120} ili Gly459_{gp120} (V5 om a; skraćeno nazvano N/DNGG konsenzusna sekvencija). U N/DNGG konsenzusnoj sekvenci (Sl. 5.) vrlo rijetko se događaju mutacije. Nadalje, YU-2 virusni mutanti izolirani iz HIV-1_{YU-2} inficiranih miševa koji su tretirani NIH45-46^{G54W} protutijelima nose mutacije unutar N/DNGG konsenzusne sekvence. Analiza 45-46m2-gp120 kompleksa pokazala je da promjene unutar N/DNGG sekvence uzrokuju ograničenja za vezanje široko neutraliziraju ih protutijela jer se zamijenjeni aminokiselinski ostaci u N/DNGG sekvenci sudaraju s Trp102_{45-46m2(HC)} i Trp47_{45-46m2(HC)} (Sl. 6.) što vodi slabom ili potpuno prekinutom vezanju protutijela. 45-46m2 protutijela neutraliziraju YU-2 mutante koji nose mutacije unutar V5 om e. Međutim, promjene aminokiselinskih ostataka na 279_{gp120} i 280_{gp120}, uključujući i A281T mutaciju kojom se stvara potencijalno N-glikolizacijsko mjesto na Asn279_{gp120}, manje su osjetljive na 45-46m2 protutijela što rezultira redukcijom neutralizacijskog potencijala. Ipak, YU^{A281T} mutanti imaju dosta narušen replikacijski potencijal u odnosu na druge viruse (Diskin i sur. 2013).



Slika 5. Interakcija N/DNGG konsenzusne sekvence (visoko konzervirani aminokiselinski ostaci u gp120 D i V5 om i) s površinom teškog (HC) i lakog (LC) lanca 45-46m2 protutijela (Prilagođeno na temelju Diskin i sur. 2013)



Slika 6. Mogući sterički sudari između lizina ili tirozina na pozicijama 279 i 280 gp120 i Trp102_{45-46m2(HC)} i Trp47_{45-46m2(HC)} teškog lanca 45-46m2 protutijela (Prilagođeno na temelju Diskin i sur. 2013)

Da bi se povećala učinkovitost 45-46m2 protutijela u borbi protiv virusnih mutanata, posebno protiv onih koji imaju mutacije u N/DNGG sekvenci, stvorena su nova protutijela pomoću kojih bi se reducirale steričke smetnje između 45-46m2 protutijela i zamijenjenih aminokiselinskih ostataka u gp120 N/DNGG sekvenci. Protutijela 45-46m7, 45-46m25 i 45-46m28 (nastala mutacijama supstitucije W47V, W47I i W47T) učinkovito su neutralizirala YU-2 N/DNGG konsenzusne varijante, ali ova protutijela i kombinacija 45-46m2/45-46m7 protutijela nisu uspjeli neutralizirati sojeve koji su bili otporni na 45-46m2 protutijela. Dodatak 10-1074 protutijela, snažnija klonaska varijanta koja prepoznaje karbohidrat-ovisne epitope povezane s gp120 V3 domom, ili P69 protutijela, karbohidrat-ovisna široko neutralizirajuća protutijela koja prepoznaju V1/V2 epitope, u smjesu (gdje se nalazi kombinacija 45-46m2/45-46m7 protutijela) rezultira neutralizacijom gotovo svih otpornih sojeva (Tab. 1.). Terapija temeljena na protutijelima u kojoj se koristi kombinacija široko neutralizirajućih protutijela za liječenje infekcije izazvane HIV-om je obavezujuća i možda bi ona mogla biti ključna u iskorjenjivanju HIV-a (Diskin i sur. 2013).

Tablica 1. IC₅₀ i IC₈₀ vrijednosti (koncentracije protutijela potrebne za neutralizaciju 50% ili 80% antigena) neutralizacije različitih sojeva HIV-a mješavinama široko neutralizirajućih protutijela (Diskin i sur. 2013)

Virus	Clade	45-46m2		45-46m2 45-46m7		45-46m2 45-46m7 PG9		45-46m2 45-46m7 10-1074	
		IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₅₀	IC ₈₀
T278-50	CRF02_AG	>50	>50	>50	>50	9.959	>50	4.598	>50
89-FI_2_25	CD	>50	>50	>50	>50	1.881	>50	>50	>50
6540.v4.c1	AC	>50	>50	>50	>50	0.204	1.004	>50	>50
Ce1172_H1	C (T/F)	>50	>50	>50	>50	0.148	0.548	>50	>50
620845.c01	CRF01_AE	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
X2088.c9	G	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
6545.v4.c1	AC	9.214	>50	7.283	>50	0.106	0.424	1.358	>50
Du422.1	C	3.837	11.071	11.071	>50	0.144	0.677	0.035	0.044
CAP210.2.00.F8	C	1.866	8.872	2.729	4.339	0.212	0.735	1.601	7.407
T250-4	CRF02_AG	1.512	2.876	5.608	>50	0.006	0.022	>50	0.002
THRO4156.18	B	0.762	2.016	0.406	1.650	0.384	1.245	0.346	1.525
3817.v2.c59	CD	0.759	4.004	1.599	18.410	0.007	0.030	0.178	0.659
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	0.692	2.574	0.302	2.539	0.135	1.176	0.353	1.304
R1166.c01	CRF01_AE	0.588	2.314	0.241	0.773	0.105	0.268	0.085	0.279
T251-18	CRF02_AG	0.394	1.346	0.269	0.738	0.295	0.579	0.089	0.263
211-9	CRF02_AG	0.351	2.239	0.438	2.894	0.166	0.489	0.063	0.157
HIV-16845-2.22	C	0.335	1.568	0.281	1.200	0.160	0.570	0.073	0.344
3103.v3.c10	ACD	0.308	0.767	0.170	0.445	0.114	0.303	0.006	0.014
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0.282	0.814	0.113	0.374	0.065	0.232	0.038	0.043
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	0.256	0.872	0.123	0.581	0.126	0.452	0.094	0.314
C1080.c03	CRF01_AE	0.245	0.854	0.109	0.523	0.005	0.017	0.115	0.425
QH0692.42	B	0.211	1.031	0.126	0.610	0.084	0.435	0.028	0.113
X2131_C1_B5	G	0.177	1.584	0.033	0.078	0.006	0.040	0.003	0.017
Ce1175_A3	C (T/F)	0.169	0.460	0.079	0.233	0.033	0.046	0.006	0.002
AC10.0.29	B	0.154	0.520	0.060	0.317	0.030	0.137	0.009	0.031
T257-31	CRF02_AG	0.135	0.494	0.060	0.254	0.038	0.109	0.036	0.156
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0.130	0.378	0.050	0.182	0.033	0.122	0.027	0.080
ZM214M.PL15	C	0.096	0.442	0.029	0.137	0.018	0.065	0.014	0.057
CAAN5342.A2	B	0.087	0.241	0.034	0.193	0.039	0.141	0.004	0.013
Ce704809221_1B3	C (T/F)	0.083	0.497	0.040	0.227	0.013	0.081	0.013	0.040
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0.080	0.195	0.030	0.106	0.010	0.062	0.006	0.026
7030102001F5(Rev.)	C (T/F)	0.080	0.380	0.040	0.158	0.036	0.127	0.002	0.009
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	0.073	0.201	0.033	0.123	0.020	0.085	0.040	0.133
CNE30	BC	0.072	0.322	0.033	0.229	0.033	0.142	0.039	0.086
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	0.069	0.402	0.023	0.225	0.013	0.122	0.018	0.093
0260.v5.c36	A	0.067	0.263	0.047	0.188	0.034	0.144	0.022	0.078
Q461.w2	A	0.065	0.246	0.035	0.145	0.027	0.095	0.018	0.084
ZM53M.PL12	C	0.057	0.220	0.024	0.105	0.016	0.040	0.018	0.049
Du172.17	C	0.056	0.295	0.028	0.091	0.036	0.138	0.012	0.032
246F.C1G	C (T/F)	0.055	0.189	0.040	0.109	0.038	0.108	0.013	0.032
900455_A3_4	A (T/F)	0.055	0.141	0.030	0.110	0.013	0.040	0.002	0.013
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0.052	0.264	0.028	0.124	0.017	0.085	0.005	0.027
CNE17	BC	0.052	0.228	0.023	0.117	0.013	0.070	0.014	0.040
Ce2010_F5	C (T/F)	0.051	0.143	0.027	0.084	0.022	0.066	0.014	0.014
928-28	CRF02_AG	0.051	0.158	0.035	0.121	0.023	0.077	0.015	0.062
191821_FB_1	D (T/F)	0.049	0.184	0.030	0.101	0.032	0.094	0.013	0.071
Ce0393_C3	C (T/F)	0.048	0.135	0.019	0.080	0.068	0.035	0.018	0.058
C2101.c01	CRF01_AE	0.048	0.167	0.017	0.080	0.010	0.037	0.018	0.064
ZM135M.PL10a	C	0.045	0.173	0.030	0.126	0.015	0.060	0.006	0.034
Ce2060_G9	C (T/F)	0.038	0.138	0.025	0.075	0.014	0.040	0.018	0.040
TR0.11	B	0.034	0.095	0.020	0.058	0.025	0.045	0.004	0.013
6811.v7.c18	CD	0.034	0.101	0.018	0.062	0.060	0.040	>50	>50
CNE5	CRF01_AE	0.033	0.168	0.025	0.159	0.003	0.019	0.010	0.058
6535.3	B	0.033	0.143	0.008	0.060	0.007	0.041	0.003	0.006
Ce703010054_2A2	C (T/F)	0.031	0.093	0.022	0.063	0.005	0.029	0.010	0.030
C4118.c09	CRF01_AE	0.031	0.111	0.008	0.038	>50	0.016	0.004	0.017
3016.v5.c45	D	0.030	0.080	0.019	0.040	0.013	0.040	0.013	0.034
ZM109F.PB4	C	0.029	0.114	0.012	0.058	0.006	0.031	0.008	0.040
SC422661.8	B	0.029	0.079	0.013	0.040	0.007	0.035	0.006	0.018
WTD4160.33	B	0.029	0.083	0.010	0.038	0.005	0.013	0.008	0.028
P1981_C5_3	G	0.029	0.063	0.013	0.050	0.004	0.024	0.001	0.003

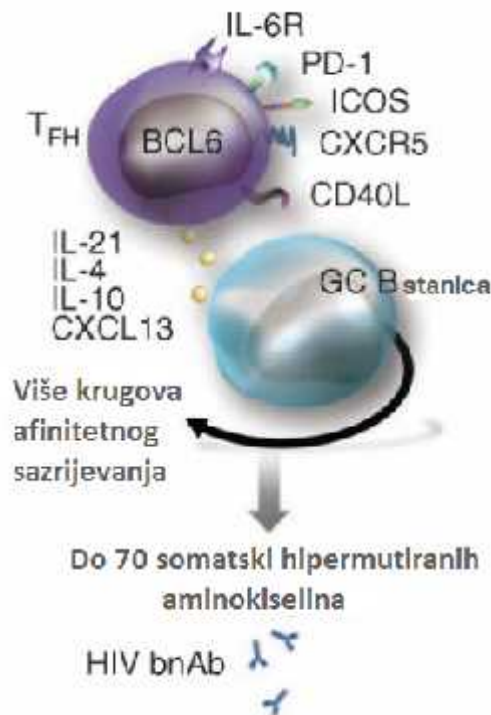
CAP45.2.00.G3	C	0.004	0.103	0.014	0.006	0.003	0.003	0.003	0.009
6244_13_85_4576	B (T/F)	0.002	0.101	0.015	0.004	0.005	0.006	0.004	0.027
ZM233M.P86	C	0.021	0.079	0.009	0.019	0.003	0.016	0.003	0.019
1394C9G1(Rev.)	C (T/F)	0.001	0.080	0.011	0.016	0.006	0.022	0.004	0.015
CNE8	CRF01_AE	0.021	0.106	0.011	0.014	0.004	0.007	0.003	0.009
M5208.A1	A	0.020	0.094	0.012	0.014	0.004	0.013	0.006	0.002
T255-34	CRF02_AG	0.009	0.140	0.006	0.051	0.002	0.021	0.001	0.017
6952.v1.c20	CD	0.018	0.081	0.007	0.029	0.004	0.011	0.003	0.011
231966.c02	D	0.017	0.076	0.011	0.003	0.006	0.018	0.006	0.000
A07412M1.vrc12	D	0.016	0.064	0.010	0.014	0.001	0.026	<0.001	<0.001
CNE21	BC	0.012	0.066	0.005	0.009	0.001	0.023	<0.001	0.017
ZM247v1(Rev.)	C (T/F)	0.019	0.088	0.009	0.014	0.004	0.012	0.003	0.015
62357_14_D3_4589	B (T/F)	0.015	0.087	0.008	0.041	0.009	0.018	0.006	0.047
231965.c01	D	0.015	0.046	0.012	0.004	0.008	0.014	0.006	0.014
Q23.17	A	0.014	0.057	0.002	0.014	<0.001	0.006	<0.001	0.002
ZM197M.P87	C	0.012	0.084	0.008	0.011	0.001	0.012	0.004	0.018
Ca0682_F4	C (T/F)	0.012	0.083	0.006	0.015	0.004	0.014	0.006	0.017
HIV-0013095-2.11	C	0.011	0.043	0.005	0.013	0.005	0.015	0.004	0.012
249M.B10	C (T/F)	0.011	0.042	0.005	0.017	0.005	0.019	0.004	0.012
X1193_c1	G	0.010	0.064	0.002	0.012	<0.001	0.009	0.001	0.011
6480.v4.c25	CD	0.010	0.011	0.005	0.019	0.002	0.009	0.003	0.017
PV0.4	B	0.009	0.066	0.007	0.011	0.006	0.011	0.004	0.017
C3347.c11	CRF01_AE	0.008	0.051	0.005	0.011	0.001	0.015	0.001	0.014
P0402_c3_11	G	0.008	0.050	0.002	0.013	0.001	0.010	0.001	0.005
RHPA4259.7	B	0.008	0.011	0.002	0.015	0.001	0.007	<0.001	0.008
REJO4541.67	B	0.004	0.019	0.001	0.011	0.002	0.010	0.005	0.017
TRJO4551.58	B	0.006	0.019	0.004	0.010	0.005	0.010	0.003	0.012
CNE20	BC	0.007	0.011	0.004	0.011	0.002	0.011	<0.001	0.002
CNE58	BC	0.007	0.005	0.005	0.004	0.002	0.018	<0.001	0.017
R2184.c04	CRF01_AE	0.007	0.014	0.001	0.011	0.002	0.011	0.002	0.017
Du156.12	C	0.006	0.016	0.002	0.010	<0.001	0.006	<0.001	0.004
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0.005	0.016	0.002	0.011	0.001	0.006	<0.001	0.001
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0.005	0.012	<0.001	0.008	<0.001	0.006	<0.001	0.004
ZM249M.N11	C	0.005	0.011	0.001	0.014	<0.001	0.006	<0.001	0.005
X1254_c3	G	0.005	0.017	0.002	0.014	<0.001	0.007	<0.001	0.005
HIV-16055-2.3	C	0.004	0.010	0.001	0.011	<0.001	0.005	0.001	0.010
191084.87-19	A (T/F)	0.004	0.018	0.001	0.014	<0.001	0.007	<0.001	0.005
0815.v3.c3	ACD	0.004	0.016	0.002	0.009	0.001	0.006	0.001	0.008
3415.v1.c1	A	0.003	0.012	0.001	0.008	<0.001	0.008	<0.001	0.001
191955_A11	A (T/F)	0.003	0.015	0.005	0.014	0.006	0.013	0.014	0.115
3301.v1.c24	AC	0.003	0.014	<0.001	0.010	<0.001	0.004	<0.001	0.002
Ca1086_B2	C (T/F)	0.002	0.011	0.001	0.007	<0.001	0.005	0.001	0.004
3365.v2.c2	A	0.002	0.015	<0.001	0.010	<0.001	0.004	<0.001	0.001
6041.v3.c23	AC	0.002	0.009	<0.001	0.006	<0.001	0.005	<0.001	0.004
Q769.d22	A	0.001	0.012	<0.001	0.004	<0.001	0.001	<0.001	0.005
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	0.001	0.009	<0.001	0.007	<0.001	0.001	<0.001	0.004
X1632_52_B10	G	0.001	0.011	<0.001	0.004	<0.001	0.002	<0.001	0.004
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	<0.001	0.011	<0.001	0.005	<0.001	0.001	<0.001	0.001
HIV-001428-2.42	C	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
BF1266.431a	C (T/F)	<0.001	0.018	<0.001	0.011	<0.001	0.007	<0.001	0.006
CNE19	BC	<0.001	0.017	<0.001	0.017	<0.001	0.009	<0.001	0.005
CNE52	BC	<0.001	0.010	<0.001	0.018	<0.001	0.007	<0.001	0.005
CNE53	BC	<0.001	0.009	<0.001	0.006	<0.001	0.004	<0.001	0.004
Q259.d2.17	A	<0.001	0.005	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.002
Q842.d12	A	<0.001	0.010	<0.001	0.004	<0.001	0.002	<0.001	0.003
263-8	CRF02_AG	<0.001	0.014	<0.001	0.010	<0.001	0.018	<0.001	0.007
235-47	CRF02_AG	<0.001	0.014	<0.001	0.009	<0.001	0.005	<0.001	0.002

IC ₅₀ and IC ₉₀ values (µg/ml)	>50	10-50	1-10	0.1-1	0.01-0.1	<0.01
--	-----	-------	------	-------	----------	-------

2.4. Korištenje stani nog odgovora $CD4^+$ T-limfocita u razvoju cjepiva protiv HIV-a

$CD4^+$ T-limfociti presudni su za postizanje u inkovito reguliranog imunskog odgovora na patogene. Naivni $CD4^+$ T-limfociti aktiviraju se nakon interakcije s antigen-MHC kompleksom i diferenciraju u specifi ni podtip što ovisi o citokinima koji se nalaze u njihovu mikrookolišu. Osim klasi nih pomo ni kih limfocita T_H1 i T_H2 , postoje i T_H17 limfociti, regulatorni T-limfociti, folikularni pomo ni ki T-limfociti (T_{FH}) i T_H9 limfociti. Svaka podskupina ima karakteristi an citokinski profil kao i specifi nu funkciju u imunskom odgovoru (Luckheeram i sur. 2012). Kod nekih osoba koje su inficirane HIV-om na ena su široko neutraliziraju a protutijela što je pružilo novu nadu da bi se mogao proizvesti snažan odgovor protutijela na virus HIV-a uz kojeg bi se mogao iskoristiti i stani ni odgovor HIV-specifi nih T-limfocita da bi se razvilo cjepivo koje bi pružilo što bolju zaštitu (Streeck i sur. 2013).

Središnji problem u istraživanju cjepiva protiv HIV-a je poticanje proizvodnje široko neutraliziraju ih protutijela. Promatranjem sekvenci ovih protutijela pokazano je da su u njihov razvoj uklju ena izuzetna iskrivljenja B-stani nog receptora (BCR). Gomilanje aminokiselinskih mutacija za vrijeme sazrijevanja ve ine HIV-specifi nih široko neutraliziraju ih protutijela je od pet do deset puta ve e nego kod prosje nih memorijskih BCR. Mutacije B-stani nog receptora u toliko velikim koli inama vrlo su rijetke kod HIV-negativnih osoba. Dobra vijest je da ljudski imunski sustav može proizvesti HIV-specifi na široko neutraliziraju a protutijela, a loša vijest je da se to vrlo teško postiže, ili se bar tako ini. Odgovor neutraliziraju ih protutijela na patogen uvelike je ovisan o pomo ni kim $CD4^+$ T-limfocitima. T_{FH} limfociti su $CD4^+$ T-limfociti specijalizirani da pomažu B-limfocitima. Selekcija i mutacija B-limfocita zbiva se u germinalnom centru. Svaki krug proliferacije i selekcije B-limfocita ovisi o signalima za proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje koje šalju T_{FH} limfociti u obliku kostimulacijskih molekula na površini stanice (npr. CD40 ligand) i sekrecijskim faktorima (npr. IL-21, IL-4) (Sl. 7.). T_{FH} limfociti su presudni u poticanju visoke razine somatske hipermutacije što je potrebno za nastanak HIV- specifi nih široko neutraliziraju ih protutijela. Da bi se $CD4^+$ T-limfociti mogli iskoristiti u razvoju cjepiva protiv HIV-a, potrebno je znati koje su njihove najvažnije osobine. Još nije poznato da li je koli ina T_{FH} limfocita važna za afinitetno sazrijevanje stani nog odgovora B-limfocita ili su za to presudni T_{FH} limfociti s posebnim funkcijama (Streeck i sur. 2013).



Slika 7. Sazrijevanje B-limfocita uz pomoć T_{FH} limfocita

(Prilagođeno na temelju Streeck *i sur.* 2013)

T_{FH} limfociti izravno su uključeni u sazrijevanje i selekciju protutijela. Većina HIV-specifičnih široko neutralizirajućih protutijela ima veliki broj mutacija što ukazuje na masivnu selekciju i afinitetno sazrijevanje u germinalnom centru prije razvoja dovoljno širokog neutralizacijskog kapaciteta. Dokazano je da većina tih mutacija procesom afinitetnog sazrijevanja daje funkcionalne proizvode. Enzim odgovoran za mutacije DNA kod B-limfocita u germinalnom centru zove se aktivacijom-potaknuta citidin deaminaza (AID). Međutim, još se ne zna kako germinalni centar povećava afinitet sazrijevanja ni kako su regulirani AID i somatska hipermutacija. Nejasno je i na koji način se aktiviraju inicijalni B-limfociti. Nije sigurno da li su naivni B-limfociti, koji eventualno mogu postati proizvođači široko neutralizirajućih protutijela, aktivirani intaktnim virionima, slobodnim Env proteinima ili antigenima u nekom drugom obliku. Pretpostavlja se da je najmanja vjerojatnost da su to intaktni virioni, a mogućnost koju mnogi uzimaju u obzir je ta da su inicijalni B-limfociti selektirani potpuno drugačijim antigenima koji unakrsno reagiraju s Env proteinima. Duboko sekvenciranje i longitudinalne analize razvoja široko neutralizirajućih protutijela i njihovog odgovora potrebni su da bi se potvrdila ova mogućnost. Druga, vjerojatnija mogućnost je da su inicijalni B-limfociti selektirani pomoću Env proteina s afinitetom koji je preslab da bi se izmjerio konvencionalnim metodama, ali koji je ipak biološki značajan i dovoljan za

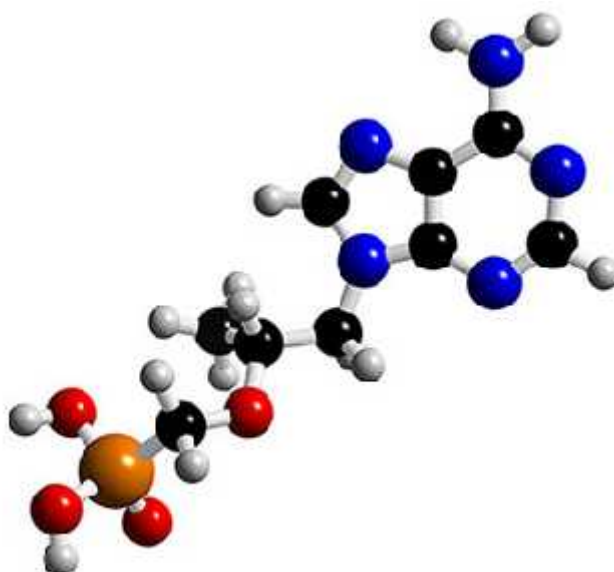
aktivaciju. Antigeni koji su vezani na membrani puno bolje aktiviraju B-limfocite nego topljivi antigeni. Da bi se dizajniralo cjepivo protiv HIV-a, potrebno je znati u kojem obliku antigen aktivira inicijalne B-limfocite i mehanizam tog prepoznavanja da bi se mogla potaknuti imunizacija putem široko neutraliziraju ih protutijela (Streeck i sur. 2013).

Neki znanstvenici predlažu da bi se bilo puno korisnije usredotočiti na proučavanje ranijih oblika HIV-neutraliziraju ih protutijela (pre-bnAbs) prije nego što se razviju u široko neutralizirajuća protutijela. Imunizacija u kojoj bi se koristila pre-bnAbs bila bi puno lakša nego imunizacija sa zrelim bnAbs jer bi bilo manje somatske hipermutacije i afinitetnog sazrijevanja. Pre-bnAb⁺ B-limfociti mogli bi imati mogućnost brzog prijelaza u zrele B-limfocite koji bi proizvodili široko neutralizirajuća protutijela nakon što bi se izložili HIV-u i tako bi se mogla olakšati kontrola virusa u akutnoj fazi infekcije HIV-om. Postoji mogućnost da vakcinacija široko neutralizirajućim protutijelima ne bi uključivala oponašanje prirodnog procesa brojnih somatskih mutacija koji je opažen kod HIV-pozitivnih osoba i da je problem repertoara B-limfocita to što se B-limfociti koji proizvode široko neutralizirajuća protutijela ne javljaju tjednima nakon infekcije HIV-om. Taj problem mogao bi se riješiti na način da se na kratko vrijeme zaobi u kontrolne točke tolerancije B-limfocita da im se poveća repertoar. Doista, tretman BLyS-om (poznatim kao BAFF) omogućio je B-limfocitima da zaobi u neke kontrolne točke tolerancije i time je omogućeno stvaranje većeg repertoara. Kod miša tretiranog BLyS-om poboljšao je odgovor HIV-neutralizirajućih protutijela (Streeck i sur. 2013).

Iako su CD4⁺ T-limfociti koji pomažu B-limfocitima vrlo važna komponenta u vakcinaciji, CD4⁺ T-limfociti koji imaju citotoksičnu aktivnost također mogu sudjelovati u sprječavanju infekcije HIV-om. Primijećeno je da je citotoksična aktivnost CD4⁺ T-limfocita usko povezana sa sporijom progresijom bolesti kod HIV-pozitivnih osoba. Unatoč tome što CD4⁺ T-limfociti imaju jako važnu ulogu u imunskom sustavu, uloge staničnog odgovora HIV-specifičnih CD4⁺ T-limfocita nepoznate su u velikoj mjeri. CD4⁺ T-limfociti uglavnom su isključeni u dizajniranju cjepiva protiv HIV-a zato što mogu biti inficirani HIV-om. Da bi se mogli iskoristiti u razvoju cjepiva protiv HIV-a, potrebno je znati kako točno koordiniraju imunski sustav i kako upravljaju staničnim odgovorom B- i CD8⁺ T-limfocita (Streeck i sur. 2013).

2.5. Novi analozi nukleotida u lije enju infekcije HIV-om

Tenofovir disoproksil fumarat TDF (pro-lijek tenofovira- TFV (Sl. 8.)) je nukleotidni analog koji oponaša deoksiadenozin monofosfat (dAMP). To je jedan od najpropisivanijih lijekova u lije enju infekcije HIV-om. U 2011. godini njime je lije eno više od tri milijuna HIV-pozitivnih osoba. GS-7340 je novi amidni pro-lijek TFV-a koji preferencijalno cilja stanice i tkiva uklju ena u replikaciju HIV-a i to ini sto puta bolje od roditeljskog TFV-a. Korištenje GS-7340 kao lijeka rezultira stvaranjem tenofovir disulfata (TFV-DP- inhibitor replikacije HIV-a) u visokim koncentracijama i bitno se reducira razina cirkuliraju eg TFV-a ime se smanjuje izloženost bubrega i kostiju TFV-om. CMX157 (heksadeciloksilpropil tenofovir) je izvedeni oblik tenofovira konjugiran s lipidom koji tako er smanjuje razinu cirkulacije tenofovira u odnosu na TDF. GS-9193 je pro-lijek u razvoju. To je adenzinski analog s dihidrofurinskom jezgrom koji ima snažnu antivirusnu aktivnost kod ve ine virusa koji su otporni na trenutne nukleotidne analoge koji su inhibitori reverzne transkriptaze HIV-a (Rooney i sur. 2013).



Slika 8. Struktura tenofovira

(www.3dchem.com)

3. PREPREKE U USPJEŠNOM RAZVOJU CJEPIVA PROTIV HIV-A

Unatoč svim naporima usmjerenim na razvoj u inkovito i sigurno cjepivo protiv HIV-a, borba s tim smrtonosnim virusom još traje. Treba se suočiti s brojnim preprekama da bi se postigao konačni cilj, a to je iskorjenjivanje tog napasnika. Prepreke su u velikoj mjeri povezane sa svojstvima Env proteina koji se nalazi na ovojnici virusa HIV-a.

Jedna od najvećih prepreka je visoka razina genetske varijabilnosti koja je potaknuta imunosnim pritiskom domaćina i ubrzana zbog brzog replikacijskog ciklusa, visoke frekvencije rekombinacije i reverzne transkriptaze HIV-a koja je sklona pogreškama. Da bi cjepivo bilo sigurno i u inkovito, trebalo bi neutralizirati sve mutante HIV-a što je jako teško postiživo i zato što je njihova raznolikost jako velika (Koff i sur. 2013). Neadekvatnost životinjskih modela je još jedan problem koji usporava razvoj cjepiva protiv HIV-a. Primarni modeli za procjenu u inkovitosti pokusnih cjepiva protiv HIV-a su SIV-rezus makaki majmuni. Kontrola kao i sprječavanje stjecanja infekcije mogu se procijeniti pomoću modela. Životinjski modeli za ljudske bolesti su nesavršeni, pa tako i modeli za HIV virus. SIV nije HIV. Imunogenetika majmuna znatno se razlikuje od ljudske i SIV nije dovoljno varijabilan da bi mogao oponašati hiper-varijabilnost HIV-a. Da bi se riješio problem neadekvatnosti životinjskih modela, razvijaju se modeli kao što su humanizirani miševi (miševi s humaniziranim imunosnim sustavom) i knockin miševi u koje su ubačeni ljudski geni za različite oblike ljudskih široko neutralizirajućih protutijela. Prije testiranja nekog cjepiva na ljudima, to isto cjepivo trebalo bi se isprobati na životinjskim modelima (Burton i sur. 2012, Koff i sur. 2013, Shapiro 2013). Nejasno je koji su imunosni odgovori potrebni za kontrolu i sprječavanje infekcije HIV-om i koje virusne komponente pobuđuju imunosni odgovor protiv HIV-a. Problem je i nedostatak prirodnog imunosnog odgovora protiv HIV-a. HIV inficira CD4⁺ T-limfocite koji su uključeni u obranu organizma i umiru ubrzo nakon infekcije ugrožavajući obrambeni sustav domaćina. Međutim, postoji jedan mali period u kojem je HIV ranjiv, a to je pri početku infekcije kada se još nalazi u limfoidnom tkivu pridruženom crijevu, pri čemu bi se to tkivo moglo iskoristiti za poticanje lokaliziranog imunosnog odgovora koji bi mogao kontrolirati infekciju (Koff i sur. 2013).

Ima puno nepoznanica koje se još trebaju istražiti, a novim metodama, kao što su imunosni monitoring, sistematska biologija, genomika, proteomika, biologija vektora i

mehanizmi adjuvantacije i dostave antigena, ta bi istraživanja trebala biti znatno olakšana u budućnosti. Osim navedenih cjepiva protiv HIV-a, postoje i druge metode prevencije infekcije, a to su obrezivanje muškaraca, profilaksa prije izlaganja HIV-u, vaginalni mikrobicidi i antiretrovirusna terapija, koje su pokazale određeni uspjeh u suzbijanju infekcije (Koff i sur. 2013, Shapiro 2013).

Da bi se spasili milijuni ljudskih života, potrebno je uništiti virus HIV-a. AIDS nije bolest s kojom bi se svijet trebao pomiriti i odustajanje od pronalaska učinkovitog cjepiva protiv HIV-a nije opcija jer iskorjenjivanje AIDS-a zahtjeva postojanje takvog cjepiva.

4. LITERATURA

- Buonaguro L., Tagliamonte M., Visciano M.L., Tornesello M.L., Buonaguro F, 2013. Developments in virus-like particle-based vaccines for HIV. *Expert Review of Vaccines* **12**, 119-127.
- Burton D., Ahmed R., Barouch D., Butera S., Crotty S., Godzik A., Kaufmann D., McElrath M.J., Nussenzweig M., Pulendran B., Scanlan C., Shief W., Silvestri G., Streeck H., Walker B., Walker L., Ward A., Wilson I., Wyatt R., 2012. Blueprint for HIV Vaccine Discovery. *Cell Host and Microbe* **12**, 396-407.
- Diskin R., Sather D.N., Marcovecchio P., Lee T., West A. Jr; Gao H., Klein F., Halper-Stromberg A., Horwitz J., Seaman M., Stamatatos L., Nussenzweig M., Bjorkman P., 2013. Restricting HIV-1 pathways for escape using rationally designed anti-HIV antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* **210**, 1235-1249.
- Koff W., Russell N., Walport M., Feinberg M., Shiver J., Karim S.A., Walker B., McGlynn M., Nweneka C.V., Nabel G., 2013. Accelerating the development of a safe and effective HIV vaccine: case study for the Decade of Vaccines. *Vaccine* **31**, B204-B208.
- Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B., 2012. CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**. Article ID 925135, 12 pages. doi:10.1155/2012/925135.
- Nelson M., 2012. Rare serotype adenoviral vectors for HIV vaccine development. *The Journal of Clinical Investigation* **122**, 25-27.
- Rooney J., Miller M., Cihlar T., Cheng A., 2013. New Nucleotides for the treatment of HIV infection. *The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **62**. doi: 10.1097/01.qai.0000429207.94107.07, 14th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, October 14-17, 2012, Baltimore, USA.
- Shapiro S., 2013. HIV Vaccine Development: Strategies for Preclinical and Clinical Investigation. *AIDS Research and Human Retroviruses* **29**. doi:10.1089/aid.2012.0337.

Streeck H., D'Souza P., Littman D., Crotty S., 2013. Harnessing CD4⁺ T cell responses in HIV vaccine development. *Nature Medicine* **19**, 143-149.

www.3dchem.com/molecules.asp?ID=343

www.mayoclinic.com/health/hiv-aids/DS00005

www.meetingsmanagement.co.uk/index.php?option=com_content&view=article&id=33&Itemid=83

www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/biology/Pages/structure.aspx

www.zdravlje.hr/zdravlje/zarazne_bolesti/hiv_aids

5. SAŽETAK

HIV (virus humane imunodeficijencije) je retrovirus koji napada imunosni sustav ovjeka. Krajnji i najteži stadij infekcije izazvane HIV-om je AIDS koji je uzrokovan teškim oštećenjima imunosnog sustava. Da bi se spriječila infekcija, potrebno je napraviti sigurno i učinkovito cjepivo protiv HIV-a, a to se pokušava na razne načine: potiče se proizvodnja široko neutralizirajućih protutijela, dizajniraju se anti-HIV-1 protutijela, koriste se novi nukleotidi i esteri slični virusima te se pokušava iskoristiti stanin odgovor $CD4^+$ T-limfocita.

Borba s tim četvrtim po redu najvećim ubojicom na svijetu još traje i brojni znanstvenici su u potrazi za cjepivom koje će uništiti virus HIV-a, spriječiti pojavu AIDS-a i spasiti milijune ljudskih života. Puno je prepreka koje znatno otežavaju potragu za učinkovitim i sigurnim cjepivom, ali s razvojem novih tehnologija i istraživanjima imunosnih puteva ta potraga bi trebala biti olakšana.

6. SUMMARY

HIV (human immunodeficiency virus) is a retrovirus that attacks human immune system. AIDS is terminal and the most severe phase of HIV infection caused by heavy damage to immune system. To prevent HIV infection, it is necessary to make an efficient and safe HIV vaccine, and attempts towards this goal are: stimulating production of broadly neutralizing antibodies (bNAbs), using rationally designed anti-HIV-1 antibodies, using new nucleotides and virus-like particles (VLPs) and by harnessing CD4+ T cell responses.

Struggle with the fourth largest killer in the world is still ongoing and many scientists have been searching for a vaccine that will destroy HIV virus, prevent AIDS and save millions of human lives. A lot of obstacles substantially complicate the search for more effective and safer vaccine, but with the development of new technologies and research of immune pathways, that search should be facilitated.